

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-267876

(43)公開日 平成7年(1995)10月17日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
A 6 1 K 38/22

識別記号  
ADS  
ACK  
ADA

F I

技術表示箇所

A 6 1 K 37/ 24  
ADS  
ACK

審査請求 未請求 請求項の数4 FD (全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平6-85906

(71)出願人 000106324

サンスター株式会社

大阪府高槻市朝日町3番1号

(22)出願日

平成6年(1994)3月30日

(72)発明者 谷口 慎次郎

西宮市上甲子園1-5-34

(72)発明者 武村 あかね

茨木市小柳町13-17-502

(72)発明者 松田 尚樹

神戸市東灘区住吉本町3-7-46

(54)【発明の名称】 細胞成長因子安定化組成物

(57)【要約】

【目的】 血小板由来細胞成長因子 (PDGF) の安定性を向上させる。

【構成】 アルギン酸ナトリウムとキサンタンガム、カルボキシビニルポリマーから選ばれた1種または2種以上とPDGFを配合した組成物。クエン酸等の添加剤を配合することもできる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞成長因子と水溶性多糖類または水溶性ビニル重合体を配合した組成物。

【請求項 2】 細胞成長因子が血小板由来細胞成長因子である請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】 多糖類高分子物質が、アルギン酸塩、キサンタンガムであり、水溶性ビニル重合体がカルボキシビニルポリマーである請求項 1 記載の組成物。

【請求項 4】 さらに、クエン酸およびその塩とラウリル硫酸及びその塩とポリソルベートから選ばれた 1 種または 2 種以上を配合した請求項 1 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は細胞成長因子の安定化に関する。詳しくは、血小板由来細胞成長因子をゲル基剤に安定に配合する技術に関する。本発明は、歯周組織の再生薬、創傷治癒剤等の細胞成長因子を配合する組成物の安定化促進技術に関する。

【0002】

【従来技術および発明が解決しようとする課題】 血小板由来細胞成長因子 (PDGF) は創傷部位に多く存在する血小板から放出される分子量約 30,000 のポリペプチドであり、はじめ、多くの動物細胞の増殖などの基本的機能を促進する因子として発見された (Antoniad es : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7314-7317, 1981)。その後、血小板のみならず、単球、上皮細胞、筋肉細胞などからも PDGF が放出されることが明らかになり (Ross et al : Cell, 45, 155-169, 1986)、個体の成長や組織の修復、再生に極めて重要な役割を演じていることが示されている (Ross : Lancet, May, 27, 1179-1182, 1989)。さらに PDGF を外科的に投与すると、皮膚の創傷 (Lynch et al : J. Clin. Invest., 84, 640-646, 1989)、潰瘍 (Pierce et al : J. Cell Biochem., 45, 319-326, 1991)、また歯周病における破壊された組織の治癒 (USP5124316) を促進することがしらされている。このように PDGF には創傷の治癒促進外用剤としての応用が期待されているが、PDGF を長期にわたり安定に含み、かつ生理活性を保持する処方が確立されていないため、未だ製品化にいたっていない。細胞成長因子一般の外用剤としての処方化には、水溶性ポリサッカロライド (EP267015) が示されているが、個々の細胞成長因子はそれぞれ異なる化学的、物理的性質を有するため、PDGF を安定に含むにはまだ改良すべき点が残されている。また担体としてのコラーゲン (EP243719) の応用も提示されているが、抗原性による生体への為害作用の問題は解決されていない。

【0003】

【課題を解決するための手段】 本発明は、PDGF とアルギン酸ナトリウム、キサンタンガムまたはカルボキシビニルポリマーを混合することにより、PDGF の活

性が安定に保持されることを見いだし、これらの組み合わせにより得られる PDGF 含有外用ゲル剤を完成し安定な PDGF 外用剤処方として提供するものである。PDGF は、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖と呼ばれる 2 種類の単量体よりなり、その組み合わせにより PDGF-AB へテロダイマー、-AA へモダイマー、-BB へモダイマーの 3 種が自然界に存在しているが、本発明によれば、このいずれのタイプの PDGF も安定化される。PDGF はヒト血小板を材料として精製することもでき、また遺伝子組み替え法により得ることもできる。これらの方法により精製された PDGF は、米国 G I B C O 社、米国 U p s t a t e Biotechnology 社などから市販されており、容易に入手することができる。処方に含まれる PDGF 濃度は用途によって異なるが、本発明によればいかなる濃度でも PDGF 活性を安定化できる。

【0004】 アルギン酸ナトリウム、キサンタンガム、カルボキシビニルポリマーは、いずれも医薬品添加物規格に収載されており、水溶性基剤として使用例も多く、安全性に問題はない。これらを材料として外用ゲル剤を得るには、いずれにおいても重量パーセントとして 0.5-5%、好ましくは 1-2% を含ませることにより、所望の安定化処方を得ることができる。

【0005】 また、用途に応じて薬理学上許容される添加物を加えることができる。これらの添加物の内、特に、クエン酸およびその塩、ラウリル硫酸ナトリウムおよびポリソルベート 60、80 を添加した場合は、PDGF の安定性がさらに向上するので、好ましいものである。これらの添加物の配合量は組成物に対し 0.001-5%、好ましくは 0.08-2% 程度である。

【0006】

【実施例】 以下に、歯周組織再生用剤としての実施例を記載する。さらに、これらの処方の中で PDGF が安定に含まれ、かつ活性も保持されていることを示す実験例と、歯周組織再生用剤としての使用例を示す。本願発明は、これらの実施例により限定されるものではない。本実施例は、以下の各実施例に基づき、各成分の必要量を秤取し、精製水を加えて攪拌して軟膏剤を製造した。

【0007】 実施例 1

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 mg
キサンタンガム	0.5 g
精製水	適 量
全 量	100 g

【0008】 実施例 2

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 mg
キサンタンガム	1 g
精製水	適 量
全 量	100 g

【0009】 実施例 3

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
キサンタンガム	5 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0010】実施例4

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
キサンタンガム	1 g
クエン酸	8 0 m g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0011】実施例5

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
キサンタンガム	1 g
ポリソルベート60	1 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0012】実施例6

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
キサンタンガム	1 g
ポリソルベート80	1 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0013】実施例7

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
キサンタンガム	1 g
ラウリル硫酸ナトリウム	1 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0014】実施例8

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
アルギン酸ナトリウム	0. 5 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0015】実施例9

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
アルギン酸ナトリウム	1 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0016】実施例10

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
アルギン酸ナトリウム	5 g
精製水	適 量

全 量 1 0 0 g

【0017】実施例11

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
アルギン酸ナトリウム	1 g
クエン酸	8 0 m g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0018】実施例12

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
アルギン酸ナトリウム	1 g
ポリソルベート60	1 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0019】実施例13

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
アルギン酸ナトリウム	1 g
ポリソルベート80	1 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0020】実施例14

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
アルギン酸ナトリウム	1 g
ラウリル硫酸ナトリウム	1 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0021】実施例15

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
カルボキシビニルポリマー	0. 5 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0022】実施例16

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
カルボキシビニルポリマー	1 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0023】実施例17

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g
カルボキシビニルポリマー	5 g
精製水	適 量
全 量	1 0 0 g

【0024】実施例18

成 分	配合量 (重量)
血小板由来細胞成長因子	1 m g

カルボキシビニルポリマー 1 g  
 クエン酸 80 mg  
 精製水 適量  
 全量 100 g

【0025】実施例19

成 分 配合量(重量)  
 血小板由来細胞成長因子 1 mg  
 カルボキシビニルポリマー 1 g  
 ポリソルベート60 1 g  
 精製水 適量  
 全量 100 g

【0026】実施例20

成 分 配合量(重量)  
 血小板由来細胞成長因子 1 mg  
 カルボキシビニルポリマー 1 g  
 ポリソルベート80 1 g  
 精製水 適量  
 全量 100 g

【0027】実施例21

成 分 配合量(重量)  
 血小板由来細胞成長因子 1 mg  
 カルボキシビニルポリマー 1 g  
 ラウリル硫酸ナトリウム 1 g

精製水 適量  
 全量 100 g

【0028】PDGFの安定性試験

実験1: PDGFが物質として3種の基剤中で安定に保持されていることを証明する実験

方法 実施例1、2、3(キサンタンガム)、実施例8、9、10(アルギン酸ナトリウム)、実施例15、16、17(カルボキシビニルポリマー)に示した混合物、および比較のためカルボキシメチセルロース、またはポリビニルピロリドンを1%含む混合物を、0.1 mlずつ8本のシリコン・コート・チューブ(シグマ社製)に分注し、4本ずつ4℃および40℃で保存した。保存直後および1、2、4ヶ月後に各サンプルの入ったチューブを4℃および40℃保存から1本ずつ取り出し、水0.9 mlを加えた溶液中のPDGF量を測定した。測定には、ヨウ素125を用いてラベルしたPDGFをトレーサーとして、抗rh-PDGF抗体を用いたラジオイムノアッセイ法(アマシャム社製)を用いた。各サンプル中のPDGF残存率は、サンプル調製時に計算上含まれるPDGF量(0.05 mg/サンプル)に対する相対比として算出した。結果を表1に示した。

【0029】

【表1】

表1: PDGFの安定化

	4℃				40℃			
	直後	1月	2月	4月	直後	1月	2月	4月
rh-PDGF水溶液	100.0	95.5	90.2	82.1	100.0	79.8	65.2	51.9
実施例1	100.0	98.4	94.3	91.8	100.0	87.8	85.5	72.3
実施例2	100.0	98.4	98.8	91.9	100.0	88.1	84.5	78.3
実施例3	100.0	99.5	97.4	97.2	100.0	92.6	89.8	80.0
実施例8	100.0	98.6	90.9	87.3	100.0	90.2	82.3	70.5
実施例9	100.0	97.0	97.9	87.7	100.0	87.5	78.8	68.2
実施例10	100.0	94.1	90.4	88.2	100.0	89.2	74.2	68.0
実施例15	100.0	92.2	88.8	86.5	100.0	87.5	78.9	60.1
実施例16	100.0	92.3	89.0	82.1	100.0	85.5	74.2	65.6
実施例17	100.0	95.0	90.9	84.9	100.0	81.0	74.4	65.9
CMC	100.0	92.2	82.1	78.4	100.0	81.1	68.7	47.4
PVP	100.0	70.5	51.7	45.6	100.0	52.0	41.3	29.5

【0030】上表に示すように、カルボキシメチセルロース、アルギン酸ナトリウム、およびカルボキシビニルポリマーは、カルボキシメチセルロース、ポリビニルピロリドン、および水溶液に較べて、PDGFを長期間安定に保持することができる。

【0031】実験2: PDGFが物質として基剤と添加剤中でより安定に保持されていることを証明する実験

方法 実施例4、5、6、7(キサンタンガムと添加剤)、実施例11、12、13、14(アルギン酸ナト

リウムと添加剤)、実施例18、19、20、21(カルボキシビニルポリマーと添加剤)に示した混合物を、0.1 mlずつ8本のシリコン・コート・チューブ(シグマ社製)に分注し、4本ずつ4℃および40℃で保存し、実験1と同様の方法によりPDGF量(相対比)として算出した。結果を表2に示した。

【0032】

【表2】

表2: PDGFの安定化(添加物を配合した場合)

	4°C				40°C			
	直後	1月	2月	4月	直後	1月	2月	4月
rh-PDGF水溶液	100.0	95.5	90.2	82.1	100.0	79.8	65.2	51.9
実施例4	100.0	95.1	95.3	95.0	100.0	95.8	90.5	85.4
実施例5	100.0	86.2	92.9	98.1	100.0	90.1	89.5	84.2
実施例6	100.0	98.5	97.0	96.5	100.0	99.6	92.8	90.1
実施例7	100.0	98.8	98.7	98.5	100.0	97.6	92.8	90.0
実施例11	100.0	98.5	95.4	92.3	100.0	83.2	92.3	85.5
実施例12	100.0	98.2	87.3	90.5	100.0	97.5	88.1	84.8
実施例13	100.0	94.3	92.4	89.2	100.0	99.2	89.2	87.7
実施例14	100.0	99.5	99.0	97.2	100.0	98.6	95.1	89.5
実施例18	100.0	96.9	92.4	89.9	100.0	92.5	89.9	85.4
実施例19	100.0	96.8	93.0	92.1	100.0	95.5	94.2	92.2
実施例20	100.0	95.0	98.8	95.9	100.0	91.0	94.4	90.4
実施例21	100.0	98.7	99.0	98.2	100.0	95.6	95.8	91.0

【0033】上表に示すように、rh-PDGFを4°Cおよび40°Cで保存から1本ずつ取り出し、1%アルギン酸ナトリウム、およびカルボキシビニルポリマー中に各種添加剤、すなわちポリソルベート60、ポリソルベート80、ラウリル硫酸ナトリウム、クエン酸を加えることにより、PDGFをより安定に長期間保持することができる。

【0034】実験3: PDGFの活性が安定に保持されていることを示す実験

方法 実施例4、5、6、7(キサンタンガムと添加剤)、実施例11、12、13、14(アルギン酸ナトリウムと添加剤)、実施例18、19、20、21(カルボキシビニルポリマーと添加剤)に示した混合物、および比較のためカルボキシメチルセルロース、またはポリビニルビロリドンを1%含む混合物を、0.1mlずつ8本のシリコン・コート・チューブ(シグマ社製)に分注し、4本ずつ4°Cおよび40°Cで保存した。保存直後および1、2、4ヶ月後に各サンプルの入ったチューブ

牛胎児血清(FBS)を含むダルベッコ変法イーグルMEM(DMEM)培地(Gibco社製)0.9mlを加えた溶液中のrh-PDGF活性を測定した。活性測定には、マウスBalb/c3T3細胞における、トリチュウムでラベルしたチミジンの取り込みによるDNA合成測定法を用いた。なお、別途、PDGF標準サンプルとして1mg/ml PDGFを0.1mlずつシリコン・コート・チューブに分注し、-20°Cで保存しておき、各サンプルのPDGF活性測定時に溶解し、1%FBSを含むDMEM培地0.9mlを加え、同様の方法でPDGF活性を測定した。各サンプル中におけるPDGF活性は、この標準サンプルのPDGF活性に対する相対比として算定した。結果を表3に示した。

【0035】

【表3】

表3: PDGFの活性安定化

	4°C				40°C			
	直後	1月	2月	4月	直後	1月	2月	4月
rh-PDGF水溶液	100.0	98.7	95.5	89.7	100.0	75.5	62.1	45.1
実施例4	100.0	98.8	97.7	94.2	100.0	89.1	80.2	60.2
実施例5	100.0	97.4	97.9	89.7	100.0	88.7	81.4	66.3
実施例6	100.0	98.5	96.0	87.4	100.0	92.0	88.8	62.0
実施例7	100.0	98.2	98.1	93.2	100.0	93.6	85.4	60.0
実施例11	100.0	97.8	96.4	90.0	100.0	91.7	84.0	65.5
実施例12	100.0	98.0	93.8	90.5	100.0	95.6	86.1	59.2
実施例13	100.0	98.9	96.8	94.1	100.0	90.7	90.2	58.7
実施例14	100.0	98.7	98.0	96.1	100.0	90.7	84.1	61.5
実施例18	100.0	97.9	96.3	90.5	100.0	91.5	78.9	55.4
実施例19	100.0	96.2	93.9	87.9	100.0	85.5	82.2	55.2
実施例20	100.0	94.2	94.4	92.2	100.0	93.6	80.2	49.6
実施例21	100.0	98.9	90.9	95.1	100.0	90.1	80.8	62.3
CMC	99.9	90.0	79.9	75.4	94.1	78.5	64.2	40.5
PVP	97.7	71.0	52.1	39.8	98.9	60.4	39.4	21.7

CMC:カルボキシメチルセルロース、PVP:ポリビニルビロリドン

【0036】上表に示すように、キサンタンガム、アルギン酸ナトリウム、およびカルボキシビニルポリマー中に各種添加剤、すなわちポリソルベート60、ポリソルベート80、ラウリル硫酸ナトリウム、クエン酸を加えることにより、PDGFの活性を長期間安定に保持することができる。

【0037】実験4: イヌ歯肉剥離搔爬手術後の歯周組織再生過程に対する作用

方法 イヌ歯肉剥離搔爬手術後の歯周組織再生過程に対するPDGF処方各種の作用を病理学的定量法により検討した。ブラッシング等によって健常な歯周組織を確立した上下顎小白歯部に、常法にしたがって歯肉剥離搔爬

手術を施した。この際、ノッチの病理組織学的定量化の基準点とするため、歯槽骨の削除を実施する前後で、根面にノッチと呼ばれる基準点を付与した。検体は実施例で示した実施例2、9、16及びさらに安定化剤配合の実施例4、12、13、21と同様のゲル剤をシリコン・コート・チューブにて4℃で2ヶ月間保存したものを投与し、対照として右側上下顎には同様の処方で薬物を配合した直後のものを投与した。手術後は歯肉弁を復位し、

縫合とパックによる保護を1週間施した。評価は術後4週目に被検部位を採取し、常法により組織標本を作成した後、顕微鏡下で接眼マイクロメーターを用いて各部位間の距離を測定し、以下の基準で定量化し、表4に結果を示した。

【0038】

【式1】

$$1 : \text{上皮のダウングロース率 (\%)} =$$

$$\frac{\text{骨削除前のノッチ下縁から上皮の再根尖側までの距離} \times 100}{\text{骨削除の長さ}}$$

【0039】

【式2】

$$2 : \text{線維性付着率 (\%)} =$$

$$\frac{\text{線維が垂直および斜走する部分の長さ} \times 100}{\text{骨削除の長さ}}$$

【0040】

【表4】

表4：イヌ歯肉剥離搔爬手術後の歯周組織再生過程に対する作用

添加剤		上皮のダウングロース率	線維性付着率
実施例2	直後	10.5 (100.0)	43.7 (100.0)
	保存後	11.2 (106.7)	41.7 (95.4)
実施例9	直後	10.9 (100.0)	39.2 (100.0)
	保存後	12.5 (114.7)	35.9 (91.6)
実施例16	直後	10.0 (100.0)	38.7 (100.0)
	保存後	11.8 (119.0)	38.8 (95.1)
実施例4	直後	9.8 (100.0)	45.3 (100.0)
	保存後	10.1 (103.1)	44.5 (98.2)
実施例12	直後	10.4 (100.0)	40.8 (100.0)
	保存後	10.9 (104.8)	39.2 (96.1)
実施例13	直後	10.8 (100.0)	38.3 (100.0)
	保存後	10.8 (99.1)	38.7 (101.0)
実施例21	直後	11.2 (100.0)	41.6 (100.0)
	保存後	11.5 (102.7)	41.1 (98.8)
C M C	直後	10.8 (100.0)	40.3 (100.0)
	保存後	13.0 (120.4)	34.1 (84.6)
P V P	直後	10.5 (100.0)	37.1 (100.0)
	保存後	14.9 (141.9)	27.1 (78.0)

( ) 内は、各サンプルの保存直後を100とした値

C M C : カルボキシメチルセルロース、 P V P : ポリビニルピロリドン

【0041】上表に示すごとく、キサンタンガム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシビニルポリマーは2ヶ月間の保存後、上皮のダウングロース抑制及び線維性付着促進において配合直後と同等の活性を示した。以上の結果から明らかに、キサンタンガム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシビニルポリマーを基剤とした処方はPDGFの組織再生活性の保持に有用である。

【0042】実験5：ラット背部創傷の組織再生過程に対する作用

方法 試験は、ウイスターラット系ラットを1群3匹としておこなった。エーテル麻酔下において、背部の毛を

バリカンで刈り取り、背部皮膚を70%エタノールで消毒した。15mmの位置を刃長15mmの木工用のノミで打ち抜き、同時に2つの傷を作創した。創傷部は、直ちに中央1箇所を縫合した後、実施例2、9、16及びさらに安定化剤配合の実施例4、12、13、21で示したと同様のゲル剤の、調製直後及びシリコン・コート・チューブにて4℃で2ヶ月間保存したものをそれぞれ1傷あたり約500mg、1日1回、5日間塗布した。4日目に抜糸、6日目に屠殺して、背部皮膚を剥離し、創傷部を幅約8mmの短冊型にメスを用いて切り取った。これをレオメーターを用いて、創傷部の裂開に要す

る張力（創耐張力）を測定した。結果を表5に示した。

【0043】

【表5】

表5：ラット背部創傷の組織再生過程に対する作用

添加剤		創耐張力 (g)
実施例2	直後	229.1 (100.0)
	保存後	211.2 ( 92.2)
実施例9	直後	210.9 (100.0)
	保存後	190.5 ( 90.3)
実施例16	直後	211.3 (100.0)
	保存後	191.9 ( 90.8)
実施例4	直後	239.3 (100.0)
	保存後	226.7 ( 97.2)
実施例12	直後	219.8 (100.0)
	保存後	208.3 ( 94.9)
実施例13	直後	211.4 (100.0)
	保存後	210.8 ( 99.7)
実施例21	直後	231.5 (100.0)
	保存後	218.2 ( 94.9)
CMC	直後	241.8 (100.0)
CMC	保存後	187.4 ( 69.2)
PVP	直後	211.0 (100.0)
	保存後	111.4 ( 52.8)

( ) 内は、各サンプルの保存直後を100とした値

CMC:カルボキシメチルセルロース

PVP:ポリビニルピロリドン

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A 6 1 K 9/00

V

47/12

J

47/20

J

47/32

J

47/34

J

47/36

J

// C 0 7 K 14/475

8318-4H

(A 6 1 K 47/32

47:12)

(A 6 1 K 47/32

47:34)

(A 6 1 K 47/32

47:20)

(A 6 1 K 47/36

47:12)

(A 6 1 K 47/36

47:34)

(A 6 1 K 47/36

47:20)

A 6 1 K 37/24

ADA